

Theileria sergenti merozoite의 합성 polypeptide 백신의 면역원성에 관한 연구

백병걸 · 서창희 · 김진호 · 김병수

전북대학교 수의과대학
(1994년 11월 21일 접수)

Study on the immunogenicity of synthetic polypeptide vaccine derived from *Theileria sergenti* merozoite

Byeong-kirl Baek, Chang-hee Seo, Jin-ho Kim, Byeong-su Kim

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, chonju 560-756, Korea

(Received Nov 21, 1994)

Abstract : Western immunoblot analysis of antigen of *T sergenti* merozoite revealed that the immunodominant proteins of this organism were characterized as the 18KD, 29KD, 34KD, 45KD and 105KD in Korea. The 34KD and 45KD among those immunodominant proteins of the parasite were isolated and their amino acid sequences from the NH₂-terminus were determined and synthesized. The respective polypeptides were cationized to enhance their antigenicity, fortified with Freund's adjuvant and tested for immunogenicity in rabbits and cattle. The results obtained were as follows;

1. *Theileria sergenti* merozoite antigen was shown in 120KD, 100KD, 66KD, 45KD, 34KD and 30KD in western immunoblot using serum of rabbits immunized with 34KD synthetic polypeptide and 70KD, 58KD, 55KD and 45KD using bovine serum. In western immunoblot, 45KD, 34KD and 30KD were recognized by immunized rabbits, and 50KD and 45KD by cattle sera immunized with 45KD synthetic polypeptide, respectively.

2. The ELISA utilizing the synthetic polypeptides demonstrated significant antibody response to the respective peptides. After the 2nd booster injection, an OD of 0.760(preimmunization 0.132) in rabbits and an OD of 0.645 (preimmunization 0.488) to 34KD synthetic polypeptide in cattle were observed. In animals immunized with 45KD synthetic polypeptide, after the 2nd booster injection, an OD of 0.640(preimmunization 0.144) in rabbit, and an OD of 0.776 (preimmunization 0.477) in cattle were measured.

3. After the 2nd booster the reciprocal IFA titer was 1:64 in rabbits and 1:512 in cattle immunized with the 34KD synthetic polypeptide. The IFA titre was observed as 1:512 in rabbit and 1:1,024 in cattle in immunized with the 45KD synthetic polypeptide.

Key words: *Theileria sergenti*, synthetic polypeptide, immunodominant, ELISA, western blot, IFA

* 본 연구는 1993년도 과기처 특정연구지원사업(지방확산화)으로 이루어 졌음.

Address reprint requests to Dr Byeong-kirl Baek, College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Chonju 560-756, Republic of Korea.

서 론

우리나라 소에서 유행하고 있는 theileriosis는 *Theileria sergenti*가 원인체로서 진드기가 밀집 서식하고 있는 목장에서 경제적 손실을 크게 끼치고 있다. 이의 예방을 위하여 약독화한 원충을 감염, 치료하는 방법이 사용되었으나^{1,2} 치료가 완전치 못한 경우 원충주의 전파 위험과 더불어 타혈액 유래성 전염병의 전파 위험성이 있다³. 저자 등은 *T sergenti* merozoite 수용성 항원을 제조하여 실험실 및 야외목장에서 예방효과를 관찰하였던 바, 일반 혈액학적 조건과 증체량에 있어서 그 예방효과를 인정할 수 있었다^{4,5}.

최근 *Plasmodium spp*, *T parva* 그리고 *Babesia spp*와 같은 주혈기생충의 예방을 위한 연구 중에서 합성 polypeptide에 대한 연구는 Helper cell과 T cell의 면역 반응 유발에 관련된 분자^{6,7,8}와 malaria에 있어서 합성 polypeptide 백신 실험^{9,10}과 Babesia병에서 있어서의 recombinant DNA를 이용한 subunit 백신의 개발 등^{11,12}의 연구가 수행되고 있다. 저자 등은 우리나라에 분포하는 *T sergenti*에 대한 항원분석 결과를 기초로 하여 특히 항원성 물질에 대한 아미노산 서열을 규명한 후 이를 합성한 바 있다¹³. 특히 *T sergenti* merozoite 수용성 항원 중 특이 항원 34KD와 비특이성 항원 45KD를 합성하여 항원성을 증강시키고자 양이온화(cationization)한 후^{14,15} 난단백을 peptide의 운반체로 하여, Freund's adjuvant로서 토끼와 소에 접종하여 면역능을 유발시켰다¹⁶. 이들 실험동물에서의 합성 peptide의 접종에 따른 항체 역가의 상승과 항원과 항체의 특이적 면역반응의 증명은 앞으로 polypeptide 백신의 개발에 필요한 기초적 자료라 사료되어 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험동물 : 가토(6개월령, n=8)와 한우(5개월령, n=8)를 합성 polypeptide의 면역형성능을 관찰하기 위한 실험동물로서 사용하였다.

Polypeptide의 합성 : *Theileria sergenti* merozoite 수용성 항원은 감염 적혈구를 용혈¹⁷, 분리한 항원성 물질을 SDS-PAGE하여^{18,19} western immunoblot을 실시하였다²⁰. *Theileria sergenti*의 항원 물질의 구조결정에 있어서 가장 항원성이 높을 것으로 인정되는 34KD와 western blot에서 면역 반응을 나타내지 않은 45KD 물질을 얻고자 PVDF(polyvinylidene difluoride) 막에 electroblotting buffer(10mM CAPS [3-cyclohexyl

amino]-1-propanesulfonic acid) in 10% MeOH)를 이용하여 50V(100-170mA)로 실온에서 30분 동안 전기 이동 시킨 후 항원 물질을 추출하여^{21,22,23} 아미노산 서열을 결정 보고¹³에 이어서 금번에는 이들 polypeptide 중 34KD와 45KD를 합성하였다^{24,25}.

Polypeptide의 양이온화 : 합성 polypeptide의 항원성을 부여 하기 위하여 양이온화를 하였다^{14,15}. 즉, 냉각 수조에서 무수 ethylene diamine(EDA) 2.68ml과 20ml의 증류수를 각각 혼합, 교반하면서 6M HCl 14ml를 첨가하여 pH 4.75로 산성화한 다음, EDA에 polypeptide(100mg/ml)를 가하여 서서히 교반시킨 후 즉시, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide 72mg를 첨가하여 실온에서 120분간 서서히 혼합시키고, 이에 4M acetate buffer(pH 4.75) 1.2ml를 가하여 반응을 정지시킨 다음, 분자량 1,000 크기의 투석관을 이용, 증류수에서 투석한 후, 농축하여 polypeptide량을 100mg/ml로 조정, 이를 단백질 운반체에 결합, 냉동보관하여 사용하였다.

Polypeptide의 운반체 결합 : 양이온화시킨 합성 polypeptide의 운반체로서 난단백을 사용하였다. 즉, polypeptide 10mg에 난단백 24mg을 혼합하면서 1% glutaraldehyde(0.1ml)를 서서히 떨어뜨린 다음 30분 동안 교반하여 1리터의 0.1M PBS(phosphate buffered saline)에서 12시간 투석시켜 얻은 합성 polypeptide을 면역원으로써 준비하였다¹⁶.

면역유발 및 항혈청의 준비 : 미국 University of Illinois, 생화학센터에서 합성한 34KD와 45KD의 합성 polypeptide와 *T sergenti*의 merozoite 수용성 항원 및 생리적 식염수를 각각 Freund's complete adjuvant와 혼합하여 접종 하였다. 또한 준비된 항원을 토끼의 피부에 100 μ g씩, 소는 견갑부 피부에 1mg씩 2주 간격으로 2차례 Freund's incomplete adjuvant와 혼합하여 추가접종 하였다. 이들 실험동물로부터 예방접종 전, 1차 접종 2주 후, 2차 접종 2주 후, 3차 접종 2주 후에 각각 채혈하였다.

Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA) : 합성 polypeptide를 항원으로 microtitre plate(Nunc Co)에 일반적인 방법에 준하여 피복하였다. 34KD와 45KD의 합성 polypeptide의 피복은 항원을 피복하기 전에 microtitre plate를 UV-crosslinker(Stratagene Co)를 이용하여 자외선을 20분간 조사한 다음, borate-buffered saline(0.1M boric acid, 25mM sodium tetraborate, 0.15M NaCl)에 polypeptide를 각각 적정 농도로 희석하여 피복하였다²⁵. 단백질 함량은 *T sergenti* merozoite의 수용성 항원의 경우 5 μ g/ml, 합성 po-

lypeptide 는 25 μ g/ml로 하였으며, 항원을 분주한 microtitre plate는 4 $^{\circ}$ C에서 1주야 방치하고, 1% bovine serum albumin을 함유한 PBS로 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 방치하므로써 비특이적인 반응을 차단하였다. 각 항원에 의하여 형성된 각 동물의 항혈청의 희석 배율은 1:100으로 하였으며 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 방치한 후 세척액(0.1% Tween 20 PBS)으로 수세하였다. Conjugate는 가토에 있어서는 peroxidase labeled anti-rabbit IgG(KPL Co)와 소에 있어서는 peroxidase labeled anti-bovine IgG(KPL Co)를 1:1,000으로 희석하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨 다음 세척한 후, 기질용액으로 o-phenyldiamine를 0.1M citrate phosphate buffer(pH 5.0)에 0.4mg/ml로 용해시킨 후 각 well당 100 μ l씩 분주하여 반응시키고 0.2N H₂SO₄로 반응을 정지시킨 다음, 분광흡도계(Behring ELISA Processor II)를 이용하여 492nm에서 흡광도(OD 값)를 측정하였다.

Western immunoblot : 합성 polypeptide의 항원항체반응의 특이성을 규명하기 위하여 *T sergenti* merozoite 수용성 항원을 이용하여 10% polyacrylamide gel에서 전기영동을 실시한 후 전기영동액(25mM Tris, 192mM glycine, 4.7M methyl alcohol)을 이용하여 젤로부터 nitrocellulose 막(이하 이동막이라 칭함)에 이동시켰다. 이동막은 0.2% Tween 20 PBS로 비특이적 반응을 차단한 후, 항혈청을 1:100으로 희석하여 이동막에 반응을 시켰다. Conjugate는 소에 있어서는 affinity phosphatase labeled goat anti-bovine IgG(KPL Co), 가토에 있어서는 affinity phosphatase labeled goat anti-rabbit IgG(KPL Co)를 1:1,000으로 희석 사용하였으며, 기질용액은 BCIP/NBT(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitroblue tetrazolium, KPL Co)를 사용하였다^{20,21}.

Indirect fluorescent antibody test(IFA) : 전보의 방법²⁶에 준하여 IFA용 slide를 준비하여 각 동물의 혈청 항체를 측정하기 위하여 IFA를 수행하였다. 합성 polypeptide의 접종 전 혈청을 음성 판정기준으로 하여 각 혈청의 역가를 측정하였으며, fluorescein-labeled goat anti-bovine IgG와 fluorescein-labeled goat anti-rabbit IgG(KPL Co)는 각각 1:40으로 희석, 항원에 부착, 항혈청과 반응시킨 후 형광현미경 하에서 항체 역가를 측정하였다.

결 과

Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA)

소견

가토에 있어서의 ELISA 소견 : *Theileria sergenti* merozoite의 수용성 특이 항원물질인 34KD를 합성한 polypeptide를 접종한 토끼에서 얻은 혈청에 대한 ELISA의 OD 값은 접종 전에는 0.132, 1차 접종 후에는 0.449, 2차 접종 후에는 0.612 그리고 3차 접종 이후에는 0.760이었으며, 45KD polypeptide로서 면역시킨 예에서는 접종 전 0.144이었던 OD 값이 1차 접종에는 0.291, 2차 접종에는 0.506 그리고 3차 접종에는 0.640이었다. *Theileria sergenti* merozoite 수용성 항원을 접종한 가토의 혈청에서 항체량 가장 높게 측정되었다. 즉, 접종 전 0.103이었던 OD 값이 1차 접종에는 0.488, 2차 접종에는 0.863 그리고 3차 접종에는 1.122으로써 비교적 높은 수준으로 관찰되었다. 생리식염수와 Freund's adjuvant만을 접종한 가토에서는 ELISA OD 값은 접종 전에는 0.140, 1차 접종에는 0.124, 2차 접종에는 0.134 그리고 3차 접종 이후에는 0.133으로 각각 관찰되었다.

소에 있어서의 ELISA 소견 : 34KD의 polypeptide를 접종한 소의 혈청에 있어서 ELISA의 OD 값은 접종 전에는 0.488, 1차 접종에는 0.550, 2차 접종에는 0.458 그리고 3차 접종 후에는 0.645로 ELISA OD 값이 관찰되었다. 45KD를 접종한 소에 있어서는 접종 전 0.477, 1차 접종 0.492, 2차 접종 0.690, 그리고 3차 접종에는 있어서는 0.776의 OD값이 관찰되었다. 한편, *T sergenti* merozoite 수용성 항원에 있어서 접종 전, 1차 접종, 2차 접종 그리고 3차 접종 후에 있어서의 OD 값은 각각 0.471, 0.512, 0.787 그리고 0.898로써 관찰되었다. 생리 식염수와 adjuvant만을 접종한 소에 있어서는 접종 전, 1차, 2차 그리고 3차 접종에 있어서 각각 0.210, 0.230, 0.250 그리고 0.220의 OD 값이 관찰되었다.

간접형광항체 역가(IFA : Indirect Fluorescent Antibody Test)

가토에 있어서의 IFA 역가 : 34KD polypeptide를 면역시킨 가토에 있어서 면역시키기 전의 IFA 역가는 1:1 이었으며, 1차 접종 2주 후 1:8, 2차 접종 후 1:32, 3차 접종 후 1:64이었고, 45KD polypeptide를 면역시킨 토끼에 있어서의 항체가는 접종 전 IFA 역가는 1:1에서 1차 접종 후 1:16, 2차 접종 후 1:64, 3차 접종 후 1:512로써 측정되었으며, *T sergenti* merozoite 항원을 접종했을 때의 항체 역가는 접종 전 1:1, 1차 접종 후 1:128, 2차 접종 후 1:256, 3차 접종 후 1:512로서 비교적 높은 항체 역가를 나타내었다. 한편, 대조군에 있어서는 1차 접종 후 1:1, 2차 그리고 3차 접종 후에

서는 1:2 이었다.

소에 있어서의 IFA 역가 : 34KD polypeptide를 접종한 소에 있어서는 접종 전의 IFA 역가는 1:8이었으며, 1차 접종 후 1:64, 2차 접종 후 1:128, 3차 접종 후 1:512으로서 추가 접종에 따른 항체 역가의 증가를 관찰할 수 있었다. 반면, 45KD polypeptide를 접종한 소에 있어서는 1차 접종 후 1:128, 2차 접종 후 1:512, 3차 접종 후 1:1,024로써 34KD에 비하여 비교적 높은 항체가를 나타내었다. 대조군에서는 1:2-1:4 수준으로서 거의 변화가 없었다. 그러나 *T. sergenti* merozoite 항원을 접종한 예에서는 1, 2 그리고 3차 접종 후에 1:256, 1:1,024 그리고 1:2,048 이상의 높은 항체 역가를 나타내었다.

Western immunoblot 소견

가토에 있어서의 western immunoblot 소견 : *Theileria sergenti* merozoite 수용성 항원을 항원으로 하여 34KD polypeptide를 면역시킨 토끼의 혈청과 면역 반응 시켰을 경우 1차 면역 이후에 120KD에서 반응을 보이기 시작했으며, 추가 접종 후에는 120KD, 100KD 및 66KD에서 비교적 강한 반응을 나타내었으나, 47KD, 45KD, 42KD, 40KD, 34KD 그리고 30KD 등에서도 미약한 반응을 볼 수 있었다. 한편, 45KD polypeptide를 면역시킨 후에는 45KD, 34KD와 30KD에서 반응이 관찰되었으며, 추가 접종 후에는 강한 반응을 나타내었다. *Theileria sergenti* merozoite 항원을 1차 면역 후에는 60KD에서 반응을 보였으며 추가 접종 후에는 항원물질 전체에서 아주 강한 반응을 관찰할 수 있었다(Fig 1).

소에 있어서의 western immunoblot 소견 : 34KD polypeptide를 1차 면역 후에 55KD, 58KD 및 70KD에서 반응을 보였으며, 2차 추가 접종 후에는 34KD에서도 미약한 반응이 관찰되기 시작하였다. 45KD의 예에 있어서는 1차 면역 후에는 58KD와 45KD에서 약한 반응을 보였다. 추가 접종 후에는 58KD와 45KD의 반응이 비교적 강하게 나타났으며 34KD 및 30KD에서도 미약한 반응을 나타내었다(Fig 2).

고 찰

소의 theileriosis는 진드기 매개 주혈기생충병으로 우리나라와 일본 등지에서 경제적 손실을 야기시키는 소의 중요한 주혈기생충병임은 주지의 사실이다^{4,27}. 이의 예방을 위하여 *T. sergenti* merozoite 표면 항원에 대한

단크론 항체²⁸, 특히 항원을 생산하는 DNA sequence를 결정하여 태반 감염 사실 규명²⁹과 PCR(Polymerase chain reaction)을 이용한 진단방법 등에 대한 광범위한 연구가 이루어지고 있다^{30,31,32}.

Theileriosis의 예방을 위한 방법의 하나로써 합성 polypeptide를 고려하게된 직접적인 동기는 다음과 같다. 즉, *T. sergenti* merozoite 수용성 항원을 이용한 백신의 생산에는 항원 준비 과정이 복잡할 뿐만아니라⁷ 감염 혈액으로부터 질병의 전파 등³과 같은 불리한 요소가 있어 일찌기 사람의 malaria병 연구에서는 특히 항원의 아미노산 서열 구조를 밝혀 이를 합성하는 연구가 이루어졌다^{10,11}. 이처럼 기생충병의 예방을 위한 polypeptide의 합성이나 유전자 재조합 기술로부터 얻은 polypeptide의 항원은 기생충 자체로부터 얻은 단백질을 대체할 수 있을 것으로 사료되어 theileriosis에 대한 연구에 있어서 관심을 갖게 되었다²⁴.

본 저자 등은 *T. sergenti* merozoite의 특이 항원물질 중 34KD와 45KD 항원의 아미노산 서열을 분석한 후 이를 합성한 polypeptide가 생체내에서의 면역 형성기능을 가토 및 소와 같은 동물을 이용하여 실험적으로 항체 형성을 관찰함은 theileriosis가 가축의 고유 질병인 점을 감안하면면 수의학계에서는 특기할 만한 연구 영역으로의 새로운 진입 일 것이다.

우리나라에 분포하는 *T. sergenti* merozoite의 항원물질 중 28KD와 34KD 물질은 SDS-PAGE와 western immunoblot에서 모두 강한 면역 반응을 나타내었지만 26KD, 45KD는 SDS-PAGE에서 가장 뚜렷한 단백질임에도 불구하고 western immunoblot에서 전혀 반응을 관찰할 수 없어 IgG에 반응되지 않는 특이성이 관찰되었다. 그런데 이에 해당하는 물질을 합성하여 가토나 소에게 접종하였던 바, 특이 항원항체 반응이 34KD 보다 강한 점은 western immunoblot만으로 특이항원의 검색과 특성을 결정하는 유일한 방법이 아님이 예측되었다. Malaria에 있어서 합성 peptide 백신 (SPf 66)의 항원성은 실험 동물의 종류에 따라서 면역 반응이 다양하게 나타난다. 즉, 사람을 포함한 쥐, 토끼 및 원숭이와 같은 실험동물의 면역 반응 정도의 차이에 관한 있다³⁴. 즉, 쥐와 토끼는 면역반응이 혈청학적으로 쉽게 입증되지만 사람이나 원숭이에서는 잘 나타나지 않는다^{24,35,36}. 또한 *in vitro*에서 합성한 polypeptide 항원성 물질을 *in vivo* 접종시 이에 대한 면역반응은 malaria의 예에 있어서 세포성 면역유발³⁷과 면역원성과 방어능력의 측면에서 설명되었지만³⁸, 아직 소에 있어서의 합성 polypeptide의 접종을 통한 면역반응기계 반응에 대한 보고는 접할 수 없는 실정인 바, 합성 po-

lypeptide를 면역자극 유발물질인 Freund's adjuvant와 더불어 가토와 한우에 접종한 후 ELISA, IFA 그리고 Western immunoblot 방법으로 항원 항체 면역반응을 통한 면역 형성 기전을 밝히는데 중요한 자료일 것으로 사료된다. *Plasmodium spp*, *Theileria spp*, *Babesia spp* 등의 충체는 MHC(Major histocompatibility complex) 항원이 나타나지 않는 적혈구 내에서만 증가되며, MHC-restricted 세포 융해 활성화의 목표가 되지 않는 점 때문에 예방 면역에 있어서 CD4+ T_H cell의 역할에 대한 관심이 집중되고 있으며, *Babesia spp* merozoite 항원은 T_H cell 반응을 유발하며, 특이 항원에 대한 cytokine이 생산되고, 생산되는 cytokine에 대한 특이성 규명 등은 앞으로 theileriosis에 대한 예방용 백신 제조에 중요한 역할을 할 것으로 사료된다^{6,7,11,34}.

합성 polypeptide을 항원으로 ELISA 수행시 항원의 피복은 poly(L)-lysine, poly(L)-glutamate, poly(L)-aspartate 등의 용액이나 glutaraldehyde 등으로 plate를 전처리 하던가, 본 실험에서와 같이 자외선을 사용하여 plate 벽에 화학적 변화를 일으켜 peptide를 부착시키는 방법이 있으나, 자외선을 이용하는 방법이 효율이 좋다³⁹. 이의 기전은 명확히 밝혀지지 않았지만 plate벽의 광산화물의 생산에 의한 것으로 알려지고 있다.

본 실험에서 합성 polypeptide로 예방 접종한 후의 IFA 역가는 전보^{5,26}의 IFA 역가보다 낮게 측정되었는데 이는 합성 polypeptide의 항원성이 낮기 때문이다. 합성 polypeptide에 의하여 생산되는 항체 역가는 높지만 IFA에서 정상적으로 반응하지 않았기 때문이다³⁴. 즉, 가토나 마우스에서는 IFA 역가를 나타내지만 원숭이와 사람이 있어서의 IFA는 높게 나타나지 않고 있어 본 실험에서 IFA 반응이 대단히 낮았던 점이 설명될 수 있다. B cell 과 T cell epitope이 함유된 *Babesia spp*에 대한 합성 polypeptide를 carrier없이 BALB/c 마우스에 접종시 강한 항체가 형성되며 입파구의 증가 사실³⁸은 본 예와 비교하여 보면 흥미있는 사실이라 사료된다.

ELISA를 수행시 34KD 합성 polypeptide를 접종한 가토와 소에 있어서 접종 전, 후의 차이는 뚜렷하지 않지만 약간의 상승 조건을 나타내었던 점 그리고 45KD 합성 polypeptide를 접종한 토끼에서 있어서는 접종 전과 후에 있어서 항체량의 확실한 차이가 있었으며 소에 있어서 3차 접종 후의 경우 34KD보다 좀 더 높은 항체 역가를 입증할 수 있었던 점 등은 동물 종간의 면역 형성기전의 특성³⁸으로서 사료된다. IFA와 Western immunoblot에서는 34KD의 동일한 물질을 접종한 토끼와 소에서 항원 항체 면역반응이 각각 다르게 관찰되었고 이는 합성 polypeptide항원이 면역세포에 있어 면역

반응 자극의 정도를 각기 다르게 할 가능성이 높다고 사료된다.

금번 연구의 결과를 요약하면 34KD 및 45KD polypeptide에 대한 실험 동물에서의 항체 생산 능력을 ELISA, IFA, 그리고 Western blot 방법으로 관찰하였던 바, 면역활성이 입증되었다. 이 같은 연구는 앞으로 합성 peptide를 이용한 진드기가 서식하고 있는 방목장에서 사육되는 소에서의 접종 시험을 통하여 야외 군주에 대한 방어 면역능력의 판정을 위한 일련의 연구로서 필요할 것으로 사료된다.

결 론

소에 있어서 theileriosis의 예방을 위하여 *Theileria sergenti* merozoite수용성 항원 중 34KD 및 45KD에 해당하는 항원을 합성하여 면역원성을 관찰하기 위하여 양이온화한 후, 운반체에 결합시켜 Freund's complete adjuvant와 Freund's incomplete adjuvant를 이용하여 소와 가토에 3차에 걸쳐 접종한 후 ELISA, IFA 그리고 Western blot으로 항원, 항체의 면역 반응능력을 관찰하였던 바, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *Theileria sergenti* merozoite 수용성 항원중 34KD 합성 polypeptide를 접종한 가토에 있어서는 120KD, 100KD, 66KD, 45KD, 34KD 및 30KD 등에서 면역 반응대를 나타내었으며, 45KD를 접종한 가토에 있어서는 45KD, 34KD 그리고 30KD등에서 반응대를 나타내었다.

2. 소에 있어서는 34KD polypeptide를 접종으로 45KD, 55KD, 58KD 및 70KD 등에서 반응을 보였으며, 45KD를 접종시 50KD 및 45KD 등에서 반응을 나타내었다.

3. 34KD와 45KD 합성 polypeptide 접종 후의 항체 형성을 ELISA로 관찰하였던 바, 가토와 소에 있어서 모두 항체역가의 상승을 관찰하였다.

4. *Theileria sergenti* merozoite 항원에 대한 IFA법에 의한 항체역가를 관찰하였던 바, 34KD를 접종한 소와 토끼에서는 1:512와 1:64까지 상승하였으며, 45KD를 접종한 소와 토끼에서는 1:1,024와 1:512까지 각각 상승하였다.

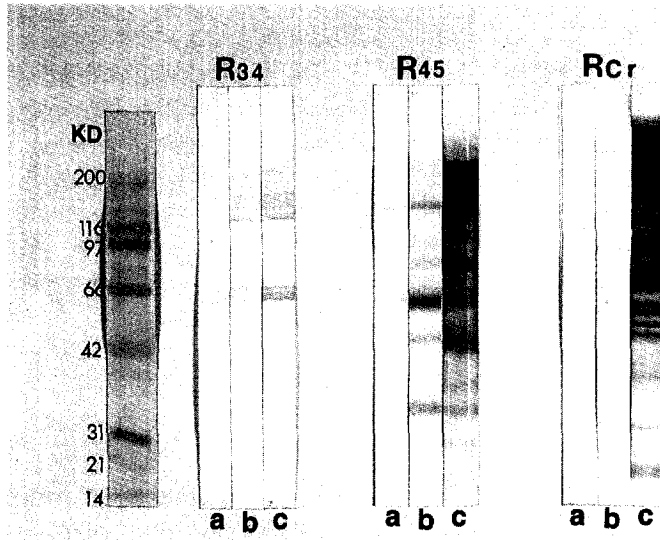


Fig 1. Western immunoblot of *T sergenti* synthetic peptide showing the immune effects in rabbit. Reacted with sera of preimmunization(a), sera of 2 weeks after 1st booster(b) and sera of 2 weeks after 2nd booster(c).

Key : R₃₄ = Immunized rabbit with 34KD synthetic peptide.

R₄₅ = Immunized rabbit with 45KD synthetic peptide.

R_r = Immunized rabbit with *T sergenti* merozoite crude antigen.

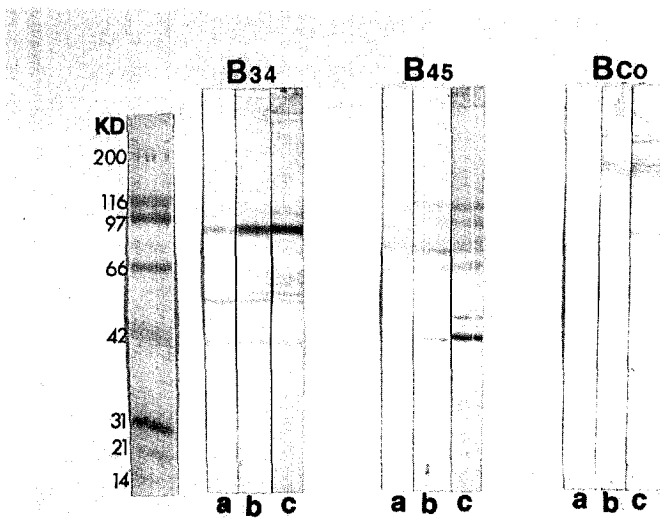


Fig 2. Western immunoblot of *T sergenti* synthetic peptide showing the immune effects in cattle. Reacted with sera of preimmunization(a), sera of 2 weeks after 1st booster(b) and sera of 2 weeks after 2nd booster(c).

Key : B₃₄ = Immunized bovine with 34KD synthetic peptide.

B₄₅ = Immunized bovine with 45KD synthetic peptide.

B_{Co} = Immunized bovine with *T sergenti* merozoite crude antigen.

참고 문헌

1. 서명득, 김배정, 이병도. 소의 피로플라즈마병에 관한 연구. I. 피로플라즈마병의 인공면역에 관한 연구. 농시보고 1972; 14:41-46.
2. Khanna BM, Dhar S, Gantam OP. Chemotherapy of experimental *Theileria annulata* infection in bovine. *Ind Vet J* 1983; 60 :603.
3. Rogers RJ, Dimmock CK, Vos AJ, et al. Bovine leucosis virus contamination of a vaccine produced *in vivo* against bovine babesiosis and anaplasmosis. *Aust Vet J* 1988; 65(9): 285-287.
4. 백병걸, 송희종, 김병수 등. 소에 있어서 주혈기 생충병의 면역학적 예방에 관한 연구. 한국수의 공중보건학회지 1991; 15(1): 127-142.
5. Baek BK, Yang KC, Choi IH, et al. Immunogenicity and protective efficacy of solubilized merozoite-enriched *Theileria sergenti* immunogen. II: Protection against natural tick challenge under field condition. *Korea J Parasitol* 1992; 30(3): 201-208.
6. Langhorne J, Meding SJ, Eichmann K, et al. The response of CD4⁺ T cells to *Plasmodium chabaudi chabaudi*. *Immunological Reviews* 1989; 112: 71-94.
7. Ruebush MJ, Hanson WL. Thymus dependence of resistance to infection with *Babesia microti* of human origin in mice. *Am J Trop Med Hyg* 1980; 29: 507-515.
8. Brown WC, Palmer GH, McElwain TF. *Babesia bovis*: Characterization of the T helper cell response against the 42-KDa merozoite surface antigen (MSA-1) in cattle. *Experi Parasitol* 1993; 77: 97-110.
9. Amador R, Moreno A, Valero V, et al. The first field trials of the chemically synthesized malaria vaccine SPf 66: safety, immunogenicity and protectivity. *Vaccine* 1992; 10(3): 179-184.
10. Patarroyo G, Franco L, Amador R, et al. Study of the safety and immunogenicity of the synthetic malaria SPf 66 vaccine in children aged 1-14 years. *Vaccine* 1992; 10(3):175-178.
11. Tim PS, Barry DN. Failure of a recombinant *Babesia bovis* antigen to protect cattle against heterologous strain challenge. *Res Vet Sci* 1988; 45: 267-269.
12. Bose R, Jacobson RH, Gale KR, et al. An improved ELISA for the detection of antibodies against *Babesia bovis* using either a native or recombinant *B. bovis* antigen. *Parasitol Res* 1990; 76: 648-652.
13. Baek BK, Kim BS, Rhim BM. Immunogenicity and protective efficacy of solubilized merozoite-enriched *Theileria sergenti* immunogens. III Characterization of immunodominant peptides. *Korea J Parasitol* 1994; 32: 111-116.
14. Muckerheide A, Apple RJ, Pesce AJ, et al. Cationization of protein antigens. I. Alternation of immunogenic properties. *J Immunol* 1987; 138: 833-837.
15. Muckerheide A, Domen RL, Michael JG, et al. Cationization of proteins. II. Alternation of regulatory properties. *J Immunol* 1987; 138: 2,800-2804.
16. Briand JP, Muller S, Van Regenmortel MHV. Synthetic peptides as antigens: Pitfalls of conjugation methods. *J Immunol Methods* 1985; 78: 59-69.
17. Dodge JT, Mitchell C, Hanaham D. The preparation and chemical characterization of hemoglobin free ghosts of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 1983; 100: 119-130.
18. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 1970; 227: 680-685.
19. Tsang VCM, Peralta JM, Simons AR. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Meth Enzymol* 1983; 92: 377-391.
20. Towbin H, Staehrlin T, Gordon L. Electrophoresis transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Aca Sci USA* 1979; 76: 4,350-4,354.
21. LeGendre N, Matsudaira P. A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing. *Academic press* 1989.
22. Matsudaira P. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene di-

- fluoride membranes. *J Biol Chem* 1987; 262(21): 10,035-10,038.
23. Campbell GH, Aley SB, Ballou WR, et al. Use of synthetic and recombinant peptides in the study of host-parasite interactions in the malaras. *Am J Trop Med Hyg* 1987; 37: 428-444.
 24. Houghten RA. General method for the rapid solid-phase synthesis of numbers of peptides: Specificity of antigen-antibody interaction at the level individual amino acids. *Pro Natl Acad Sci* 1985; 82: 5131-5135.
 25. Boudet F, Theze J, Zouali M. UV-treated polystyrene microtitre plates for use in an ELISA to measure antibodies against synthetic peptides. *J Immunol Methods* 1991; 142: 73-82.
 26. Baek BK, Choi IH, Kim BS, et al. Immunogenicity and protective efficacy of solubilized merozoite-enriched *Theileria sergenti* immunogens. I. Protection against homologous stabulate challenge. *Korea J Parasitol* 1992; 30(2): 133-140.
 27. 김인철, 손재영. 진드기의기생이 많은 목장에서 *Theileria sergenti* 감염 유우의 분만 후 혈액상 및 비유량의 변동에 관한 연구. *한축지* 1984; 26(2): 137-144.
 28. Kobayashi N, Onuma M, Kirisawa R, et al. Monoclonal antibodies against intraerythrocytic merozoite(Piroplasms) of *Theileria sergenti*. *Jpn J Vet Sci* 1987; 49: 697-702.
 29. Baek BK, Kim JH, Kubota S, et al. Vertical transmission of *Theileria sergenti* in cows verified by polymerase chain reaction. *J Clin Microbio* (Received 1994; JCM 965-94).
 30. 김명철, 이주목, 권오덕 등. *Theileria sergenti* DNA probe를 만들기 위한 기초 연구. *대한수의학회지* 1993; 33(3): 479-486.
 31. Tanaka M, Matsuba T, Onoe S, et al. Biotin-labeled genomic DNA probe for the detection of *Theileria sergenti* and its nucleotide sequence. *J Protozool Res* 1992; 2: 34-39.
 32. Tanaka M, Onoe S, Matsuba T, et al. Detection of *Theileria sergenti* infection in cattle by using polymerase chain reaction amplification of parasite specific DNA. *Clin Vet Microbiol* 1993; 31(10): 2565-2569.
 33. Rocha CL, Murillo LA, Mora AL, et al. Determination of the immunization schedule for field trials with the synthetic malaria vaccine SPf 66. *Parasite Immunology* 1992; 14: 95-109.
 34. Millet P, Campbell GH, Sulzer AJ, et al. Immunogenicity of the *Plasmodium falcifarum* asexual blood-stage synthetic peptide vaccine SPf 66. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48(3): 424-431.
 35. Sutcliffe JG, Shinnick TM, Green N. Chemical synthesis of a polypeptide predicted from nucleotide sequence allows detection of a new retroviral gene product. *Nature* 1980; 287:801-805.
 36. Merrifield RB. Solid phase peptide synthesis. 1. The synthesis of a tetrapeptide. *J Am Chem Soc* 1963; 85: 2149-2154.
 37. Murillo L, Tenjo FA, Clavijo OP, et al. A specific T-cell receptor genotype preference in the immune response to a synthetic *Plasmodium falcifarum* malaria vaccine. *Parasite Immunology* 1992; 14: 87-94.
 38. Chauhan VS, Chatterjee S, Johar PK. Synthetic peptide based on conserved *Plasmodium falcifarum* antigens are immunogenic and protective against *Plasmodium yoelii malaria*. *Parasite Immunology* 1993; 15: 239-242.
 39. Zouali M, Stollar BD. A rapid ELISA for measurement of antibodies to nucleic acid antigens using UV-treated polystyrene microplates. *J Immunol Meth* 1986; 90: 105-110.